

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20247003

研究課題名 (和文) シグナルセンターとしての師部機能の解明

研究課題名 (英文) Analysis of phloem function as a signaling center

研究代表者

福田 裕穂 (FUKUDA HIROO)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：10165293

研究成果の概要 (和文)：

多細胞生物の組織構築は、細胞間の密なコミュニケーションを通して初めて可能になると考えられる。近年のシロイヌナズナ分子遺伝学を用いた解析から、植物の組織構築においても複雑な細胞間コミュニケーションネットワークが必要であることが分かってきた。しかし、細胞間コミュニケーションシステムの分子実体が示された例は極めて少ない。

維管束は師部、前形成層・形成層、木部からなる組織で、動物の血管、神経系同様、栄養と情報を伝達する組織として重要である。私たちは、これまで木部細胞分化を *in vitro* 培養系及びシロイヌナズナ・イネの突然変異体を用いて解析してきた。そして、細胞外因子により、木部道管細胞分化が促進されたり抑制されたりすることを、世界に先駆けて明らかにしてきた。その過程で、師部が維管束組織構築のシグナルの受け手としても発信地としても機能していることを見出した。このような状況の下、私たちは師部を中心にしたシグナル伝達系を明らかにすることで、師部とそのまわりの細胞との細胞間相互作用、ひいては植物の組織構築における細胞間相互作用の基本的原理を明らかにしようと考えた。

本研究は、3つの方向性をもって進められた。1つは私たちが2006年に単離同定した小ペプチド TDIF が師部で合成され分泌されるという事実をもとに、師部の維管束分化における役割を明らかにしようというものである。2つめは、私たちが同定した、イネの横走維管束形成に関与し、師部で発現するレセプターキナーゼ COE1 の機能解析を進めることで、師部のシグナルセンター機能を解析しようとするものである。3つめは、これらとはまったく異なる新たな挑戦的な方法で師部関連因子を同定しようというものであり、ここには、師部分化系の開発、師部分化関連転写因子の網羅的同定などが含まれた。すべてがうまくいったわけではないが、3方向からのアプローチにより、師部のシグナルセンターとしての働きが明確に示された。特に、師部が幹細胞維持のためのニッチ細胞として働くという発見は、今後の植物の分裂組織構築研究の展開上極めて重要であると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

Plant body plan is regulated by the tight network of cell-cell communication. Vascular plants possess a unique long-distance transport system of nutrients and signals, named the vascular system. The vascular system consists of xylem, phloem and procambium/cambium, which gives rise to xylem and phloem cells. We have identified TDIF, a dodeca-peptide that regulates vascular development as an intercellular signal secreted from phloem. In this study, therefore, we analyzed the function of phloem-related signals involved in vascular development. For this purpose we focused on the following three themes. 1) To elucidate the function of TDIF as a phloem signal and consequently to understand of the status of phloem. 2) To analyze the function of COE1 receptor kinase, whose gene may be expressed in phloem cells and function in vascular pattern formation of rice. 3) To identify new transcription factors that regulate TDIF expression in phloem. As a result, we succeeded in demonstrating that phloem cells functions as niche cells in the maintenance of vascular stem cells such as procambial and cambial cells by providing TDIF as a intercellular factor promoting self-renewal of stem cells and inhibiting xylem cell differentiation. We also indicated that COE1 functions in spatial regulation of vascular tissue differentiation in concert with auxin and brassinosteroid signals. Finally we isolated transcription factors

regulating the *CLE41* gene encoding TDIF, using a new comprehensive transcription factor screening method. These findings casted a new light on function of the phloem cells as a signal center.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	15,400,000	4,620,000	20,020,000
2009年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2010年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	37,800,000	11,340,000	49,140,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：成長生理、植物、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の組織構築は、細胞間の密なコミュニケーションを通して初めて可能になると考えられる。近年のシロイヌナズナ分子遺伝学を用いた解析から、植物の組織構築においても複雑な細胞間コミュニケーションネットワークが必要であることが分かってきた。しかし、細胞間コミュニケーションシステムの分子実体が示された例は極めて少ない。

これまでに、細胞間コミュニケーションシグナルとしては、茎頂における CLV3 が L1/L2 層でつくられ L3 層に運ばれ、そこで幹細胞の分裂を制御すること (Flecher et al., Science, 1999, Brand et al., Science, 2000)、内皮と皮層の分化に Short Root タンパク質がシグナルとして関与すること (Cui et al., Science, 2007)、またサイトカイニンシグナル系が根における原生木部道管の分化に関与すること (Mahonen et al, Science, 2006) が明らかになっている他は、ほとんど明らかになっていない。

維管束は師部、前形成層・形成層、木部からなる組織で、動物の血管、神経系同様、栄養と情報を伝達する組織として重要である。私たちは、これまで木部細胞分化を *in vitro* 培養系及びシロイヌナズナ・イネの突然変異体を用いて解析してきた。そして、細胞外因子により、木部道管細胞分化が促進されたり抑制されたりすることを、世界に先駆けて明らかにしてきた (Motose et al., Nature, 2004, Ito et al., Science, 2006, Fukuda, Nature Rev Mol

Cell Biol, 2004, Fukuda et al., Curr Opin. Plant Biol, 2007)。その過程で、師部が維管束組織構築のシグナルの受け手としても発信地としても機能していることを新規に見出した。一方で、師部分化についてのこれまでの研究は、以下に示すようにほとんど進んでいない。*in vitro* 培養系は R.D. Sjolund により開発されているが、カルスの中の一部が師部組織に変わるといふもので、分子機構の解明には使えない。ごく最近、Palauqui らにより、師部のマーカー遺伝子が数個報告された (Bauby et al., PCP, 2007)。また、Helariutta のグループによる、APL 転写因子が師部と木部の切り替えに働くという結果 (Bonke et al., Nature, 2003) が、唯一、師部の分化の調節を示した例である。

2. 研究の目的

上記背景のもとで、私たちは師部を中心にしたシグナル伝達系を明らかにすることで、師部とそのまわりの細胞との細胞間相互作用、ひいては植物の組織構築における細胞間相互作用の基本的原理を明らかにしようと考えた。具体的には、3つのテーマを設定した。1つは私たちが 2006 年に単離同定した小ペプチド TDIF が師部で合成され分泌されるという事実をもとに、師部の維管束分化における役割を明らかにしようというものである。2つめは、私たちが同定した、イネの横走維管束形成に関与し、師部で発現するレセプターキナーゼ COE1 の機能解析を進めることで、

師部のシグナルセンター機能を解析しようとするものである。3つめは、これらとはまったく異なる新たな挑戦的な方法で師部関連因子を同定しようというものであり、ここには、師部分化系の開発、師部分化関連転写因子の網羅的同定などが含まれた。

### 3. 研究の方法

基本的には、分子生物学的手法、遺伝学的手法、植物生理学的手法、生化学的手法、細胞生物学的手法、すべてを用いて解析を行った。そのうちで、特筆すべき方法を以下に記す。

ペプチドを用いる利点は、植物に投与することで表現型が観察できることであり、この性質を利用して、外から与えた TDIF に対して非感受性になる突然変異体をスクリーニングした。その結果、非感受性突然変異体が得られ、遺伝学的解析、生化学的解析の結果、その原因遺伝子が受容体をコードしていることが明らかになった。

### 4. 研究成果

#### (1) TDIF 受容体 TDR の機能の解明

TDIF 処理により葉脈の道管の連続性が失われる。これを指標に、TDIF 耐性の突然変異体のスクリーニングを行った。これまでの予備的な調査から、道管の連続的な TDIF 耐性になるシロイヌナズナ変異体を3種見いだしていた。この変異の解析から、TDIF 耐性変異体の原因遺伝子を同定し、TDR と名付けた。TDR 遺伝子は LRR-RLK クラス XI のタンパク質をコードしていた。次に、TDR が TDIF の受容体であるかどうかを、*in vitro* の結合を測定することで調査した。TDR のキナーゼ相当部分をハロタグに置き換え、タバコ培養細胞中で過剰発現した。その膜画分を用いて、CLE ペプチドとの結合実験を行ったところ、TDR は TDIF と特異的に結合することが明らかとなった。この結果と、これまで得られた遺伝学的・生理学的実験を合わせて、TDR が TDIF の特異的な受容体であると結論した。

TDR の機能解析の一環として、pTDR-GUS ラインを譲り受け、その発現を詳細に検討したところ、TDR はどの組織でも前形成層に特異的に発現することが明らかとなった。また、TDR の機能欠損変異では、前形成層の数が減っていた。これまで

の結果を総合して、(1) TDIF は師部から分泌され、形成層細胞において TDR により受容される、(2) そのシグナルは、形成層細胞の分裂を促進するとともに、形成層からの木部道管への分化を抑制する、と結論した。これは、木部と師部のシグナルのクロストークを示す初めての証拠となった。

#### (2) 師部で産生される TDIF による幹細胞維持の制御機構の解明

TDIF をコードする *CLE41* は師部特異的に発現する。この師部特異的な発現が維管束幹細胞である前形成層細胞の維持に必要なかどうかを明らかにするために、突然変異体を探索した。しかし、利用可能な T-DNA 挿入変異体は存在しなかった。そこで、Tilling ラインの選抜を行った。その結果、*null mutant, cle41-1* を手に入れることができた。この *cle41-1* 変異体の表現型は受容体である *tdr* と同じように、前形成層細胞の減少と木部分化の促進を引き起こすことから、実際に師部での TDIF の産生が前形成層の維持に関与することが証明された。

#### (3) TDIF-TDR シグナルのターゲット WOX4 の同定

CLA3-CLV1 シグナルカスケードでは転写因子の WUS が主要な下流の因子となっている。そこで、WUS のホモログである WOX ファミリーの遺伝子の発現が TDIF で誘導されるかどうかを調べた。WOX 遺伝子のうち、WOX4 遺伝子のみが TDIF により1時間以内に発現の促進がおこった。WOX4 の機能欠損変異体では、前形成層細胞数の減少が見られた。野生型では、TDIF 処理により、前形成細胞の増加と前形成層細胞から木部細胞への分化阻害の2つの事象が誘導される。しかし、WOX4 の機能欠損変異体では TDIF は分化阻害を引き起こすものの、前形成細胞の分裂を促進しなかった。複数の他の結果と合わせて、WOX4 は TDR の下流で前形成層細胞の分裂を促進する転写因子として機能していることが明らかとなった。

これまでに同定してきた TDIF ペプチド、TDR 受容体、ターゲット転写因子 WOX4 の維管束幹細胞発生運命における役割を、胚軸二次肥大時の維管束メリステムをもとに解析した。その結果、TDIF-TDR シグナルは、形成層細胞の分裂を促進するとともに、前形成層細胞・形成層細胞から木部への抑制という二つの作用を同時に果たすことで、維管束幹細胞の維持を行っていることが示

された。WOX4はTDRの下流で形成層細胞の分裂を促進する転写因子として機能しているが、*wox4 tdr*の二重変異体では表現型が重篤になることから、WOX4上流でTDR以外のシグナルの制御があることも示唆された。

これまでの研究から、以下のシグナル伝達の仕組みが明らかになった。師部細胞は維管束幹細胞(SC)維持のニッチ細胞(NC)として働き、その維持のためのシグナルとして、12アミノ酸からなるTDIFを分泌する。TDIFは維管束幹細胞である前形成層細胞上のTDRにより受容され、幹細胞維持のための2つの働きをする。1つは幹細胞の細胞分裂促進であり、1つは幹細胞からの木部への分化の阻害である。この幹細胞分裂のターゲットがWOX4転写因子である。今後の課題は、まだ未解明な分化抑制のターゲットを明らかにすることとWOX4下流の制御機構の解明であろう。

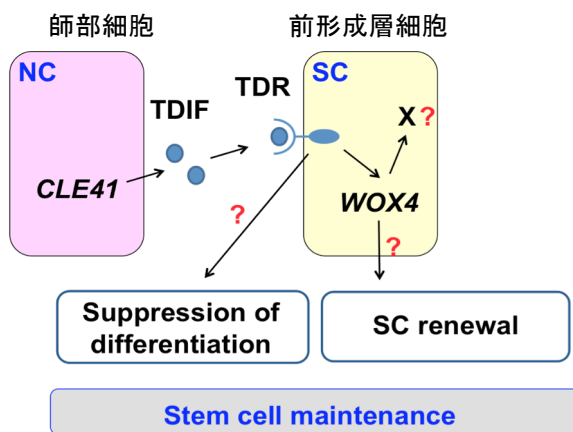


図 1

#### (4) COE1 遺伝子機能の解析

私たちは師部に関連したシグナル伝達システムの1つとして、ロイシンリッチリピート型受容体キナーゼ(LRR-RLK)であるCOE1 (*Commissural Vein Excessive 1*; *COE1*)の上流シグナルに関する解析を行った。*coel*変異体では、連絡脈の形成間隔が狭くなる表現型に加え、塊状の連絡脈を形成する。3つのアレルの*coel*変異体の塊状の連絡脈の形成頻度を比較した結果、1塩基置換変異体の*coel-1*では10%弱だったのに対しT-DNA挿入された*coel-2*、*coel-3*は40%強という高い頻度を示すことを明らかにした。これらの表現型における植物ホルモンの作用を検討した。オーキシンと連絡脈の形成間隔の関連について調査した。その結果、野生型のイネでは培地中のオーキシン濃度

に比例して連絡脈の形成間隔が広がることを明らかにした。一方で*coel*変異体は連絡脈の形成間隔に関してオーキシンに非応答だったことからCOE1はオーキシンシグナルの下流で機能する可能性が示唆された。植物ホルモンの一種であるブラシノステロイドと連絡脈の形成間隔の関連について調査した。その結果、*coel*変異体は半矮性や節間伸長の低下など一部のブラシノステロイド応答に関わることが示された。次に、ブラシノステロイド受容体に変異を持つ*d61*変異体の解析と野生型イネへのブラシノステロイド添加実験を行い、ブラシノステロイドもまた連絡脈の形成間隔の制御に関与することを明らかにした。一方で、塊状の連絡脈形成にブラシノステロイドは抑制的に働くことを明らかにした。このように、COE1は多分師部においてシグナルを受容し、その近傍での連絡脈形成の阻害を促進する。一方で、オーキシンシグナルとブラシノステロイドシグナルはその下流にあるCOE1を正に制御することで連絡脈の形成間隔を制御するというモデルを提示した。

また、イネCOE1に対するシロイヌナズナホモログの解析を行い、師部に発現することを明らかにした。

#### (5) 師部マーカー遺伝子の同定

ヒヤクニチソウを用いたアレイ解析と師部関連転写因子導入植物体でのアレイ解析から得られたデータをもとに、師部関連遺伝子を10種程度推定した。これらのマーカーラインを作成または他の研究者から分与してもらい、発現を調べた結果、2種のマーカーラインが師部マーカーとして使えることが明らかとなった。これらの発現を詳細に調べ、1つは未成熟師部の、他の1つは師部伴細胞に局在することが明らかとなった。

#### (6) 師部細胞での遺伝子発現を制御する転写因子の同定

データベースと私たちの研究室独自のマイクロアレイの結果に基づき、維管束に強く発現する330の転写因子遺伝子を選抜した。これら転写因子遺伝子をVP16に繋ぐとともにエストロゲン誘導型ベクターに挿入し、コンストラクトを作成した。これらのコンストラクトを維管束転写因子プールとして保存した。このプールを用いて、師部特異的に発現する*CLE41*遺伝子の上流に結合する転写因子の探索を、*CLE41<sub>pro</sub>::GUS*とプールコンストラクトを、

アグロバクテリウムを用いて同時にタバコの葉に一過的発現させることで行った。その結果、師部に強く発現する転写因子の遺伝子が特異的に *CLE41* 遺伝子の上流に結合することが明らかとなった。

(7) 単細胞からの師部分化系作成の試み  
単細胞からの師部分化系作成の第一歩として、シロイヌナズメ葉肉細胞の遊離細胞の分離とその培養系の確立を試みた。その結果、シロイヌナズメから細胞壁のある単離葉肉細胞を生理活性がある状態で培養する系の構築に成功した。この系では低頻度であるが細胞分裂も観察された。しかし、この遊離細胞を用いた師部分化は現在まで成功していない。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 34 件のうち主な 18 件)

- ① Hirakawa Y., Kondo, Y. and Fukuda, H.: Establishment and maintenance of vascular cell communities through local signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14:17-23, 2011.
- ② Oda, Y. and Fukuda, H.: Dynamics of *Arabidopsis* SUN proteins during mitosis and involvement in nuclear shaping. *Plant J.* in press, 2011
- ③ Miyazawa, H., Oka-Kira, E., Sato, N., Takahashi, H., Wu, G.J., Sato, S., Hayashi, M., Betsuyaku, S., Nakazono, M., Tabata, S., Harada, Y., Sawa, S., Fukuda, H., and Kawaguchi, M.: A receptor-like kinase, KLAVIER, mediates systemic regulation of nodulation and non-symbiotic shoot development in *Lotus japonicus*. *Development*, in press, 2011.
- ④ Horiguchi, G., Nakayama, H., Ishikawa N., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H. and Tsukaya, H.: *ANGUSTIFOLIA3* plays roles in adaxial/abaxial patterning and growth in leaf morphogenesis. *Plant Cell Physiol.* 52: 112-124, 2011.
- ⑤ Kondo, Y., Hirakawa, Y., Kieber, J. and Fukuda, H.: CLE peptides can negatively regulate protoxylem vessel formation via cytokinin signaling. *Plant Cell Physiol.*, 52: 37-48, 2011.
- ⑥ Betsuyaku, S., Takahashi, F., Kinoshita, A., Miwa, H., Shinozaki, K., Fukuda, H. and Sawa, S.: Mitogen-Activated Protein Kinase regulated by the CLAVATA receptors contributes to the shoot apical meristem homeostasis. *Plant Cell Physiol.*, 52: 14-29, 2011.
- ⑦ Oda, Y., Iida, Y., Kondo, Y. and Fukuda, H.: Wood cell-wall structure requires local 2D-microtubule disassembly by a novel plasma membrane-anchored microtubule-associated protein. *Curr. Biol.* 20: 1197-1202, 2010.
- ⑧ Ohashi-Ito, K. and Fukuda, H.: Transcriptional regulation of vascular cell fates. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 670-676, 2010.
- ⑨ Sakaguchi, J., Itoh, J.-I., Ito, Y., Nakamura, A., Fukuda, H. and Sawa, S.: COE1, an LRR-RLK responsible for commissural vein pattern formation in rice. *Plant J.*, 63:405-416, 2010.
- ⑩ Hirakawa Y., Kondo, Y., and Fukuda, H.: TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the *wox4* homeobox gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22: 2618-2629, 2010.
- ⑪ Ohashi-Ito, K., Oda, Y. and Fukuda, H.: *Arabidopsis* VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 directly regulates genes that govern programmed cell death and secondary wall formation in a coordinated way during xylem differentiation. *Plant Cell*, 22: 3461-3473, 2010.
- ⑫ Naramoto, S., Kleine-Vehn, J., Robert, S., Fujimoto, M., Dainobu, T., Paciorek, T., Ueda, T., Nakano, A., Van Montagu, M. C. E., Fukuda, H., and Friml, J.: ADP-ribosylation factor (ARF), guanine nucleotide exchange factor (GEF), and GAPase-activating protein (GAP) function in endocytosis of plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 107: 21890-21895, 2010.
- ⑬ Motose, H., Iwamoto, K., Endo, S., Demura, T., Sakagami, Y., Matsubayashi, Y., Moore, K. L. and Fukuda, H.: Involvement of phytosulfokine in the attenuation of stress response during the transdifferentiation of *Zinnia* mesophyll cells into tracheary elements. *Plant Physiol.* 150: 437-447, 2009.
- ⑭ Naramoto, S., Sawa, S., Koizumi, K., Uemura, T., Ueda, T., Friml, J., Nakano, A. and Fukuda, H.: Phosphoinositide-dependent regulation of VAN3 ARF-GAP localization and activity essential for vascular tissue continuity in plants. *Development* 136: 1529-1538, 2009.
- ⑮ Hirakawa Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M., Sawa, S., Ohashi-Ito, K., Matsubayashi, Y. and Fukuda, H.: Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fates by a CLE peptide/receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 15208-15213, 2008.
- ⑯ Yamaguchi, M., Kubo, M., Fukuda, H. and Demura, T.: VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 is involved in differentiation

of all types of xylem vessels in Arabidopsis roots and shoots. *Plant J.* 55: 652-664, 2008.

- ⑰ Sakaguchi, J. and Fukuda, H.: Cell differentiation in the longitudinal veins and formation of commissural veins in rice (*Oryza sativa*) and maize (*Zea mays*). *J. Plant Res.* 121: 593-602, 2008.
- ⑱ Endo, S., Pesquet, E., Tashiro, G., Kuriyama, H., Goffner, D., Fukuda, H. and Demura, T.: Transient transformation and RNA silencing in *Zinnia* tracheary element differentiating cell cultures. *Plant J.* 53: 864-875, 2008.

[学会発表] (計 86 件のうち主な 6 件)

- ① Fukuda, H., Kondo, Y. and Hirakawa, Y.: Peptide signals governing vascular stem cell fates. Keystone symposia 2010, Granlibakken Resort, Tahoe City, California, USA, March 14-19, 2010. (invited)
- ② Fukuda, H., Kondo, Y. and Hirakawa, Y.: CLE peptides regulating vascular stem cell fates. 21st International Conference on Arabidopsis Research, Yokohama, Japan, June 6-10, 2010. (invited)
- ③ Fukuda, H., Oda, Y. and Ohashi-Ito, K.: Cellular and transcriptome analyses of xylem formation with Arabidopsis cell culture systems harboring inducible *VND6* and *SND1*. *Plant Vascular Biology 2010*, Ohio State University, Ohio, USA, July 23-28, 2010. (invited)
- ④ Fukuda, H., Ohashi-Ito, K. and Oda, Y.: A novel membrane-associated protein regulating secondary wall patterns in an Arabidopsis cell culture harboring inducible *VND6*. Cold Spring Harbor Asia Symposium "From Plant Biology to Crop Biotechnology", CSH Asia, Suzhou, China, October 25-29, 2010. (invited)
- ⑤ Fukuda, H., Kondo, Y. and Hirakawa, Y.: Crosstalk between xylem and phloem production through a peptide. *Plant Vascular Biology and Agriculture 2009*, Chongqing, China, June 22, 2009. (invited)
- ⑥ Fukuda, H.: Cell-cell communication governing vascular tissue organization. The XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. Tampere, Finland, August, 21 2008 (invited, Plenary lecture)

[図書] (計 3 件)

- ① Fukuda, H.: Plant tracheary elements. In "Encyclopedia of Life Sciences", DOI:10.1002/9780470015902.a0001814.pub2, Wiley Online Library, Wiley-Blackwell, 2010.
- ② Kärkönen, A., Santanen, A., Iwamoto K., and Fukuda, H.: Plant tissue cultures. In "Methods in Molecular Biology: The Plant Cell Wall" (eds. Z. A. Popper), vol. 715, 1-20, 2011.

- ③ 平川有宇樹、近藤侑貴、福田裕穂 : CLE ペプチドによる維管束形成の制御、植物のシグナル伝達—分子と応答 (柿本、高山、福田、松岡編)、共立出版、p.172-177、2010。

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/seigyolab.html>

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
福田裕穂 (FUKUDA HIR00)  
東京大学・大学院理学系研究科・教授  
研究者番号 : 10165293
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
なし